

CHEMOKINE LD78 GENE GROUP AND HOMOLOGOUS PEPTIDE

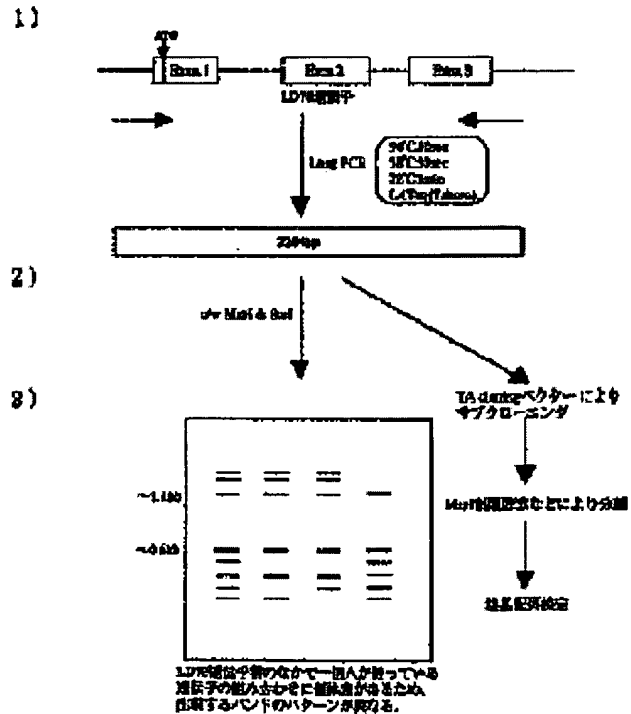
BEST AVAILABLE COPY

Patent number: JP2000157285
Publication date: 2000-06-13
Inventor: OBARA KENJI
Applicant: OBARA KENJI
Classification:
 - international: **A61K38/00; A61P31/18; A61P35/00; C07K14/52; C12N15/09; C12Q1/68; G01N33/15; A61K38/00; A61P31/00; A61P35/00; C07K14/435; C12N15/09; C12Q1/68; G01N33/15; (IPC1-7): C12N15/09; A61K38/00; A61P31/18; A61P35/00; C07K14/52; C12Q1/68; G01N33/15**
 - european:
Application number: JP19980375852 19981130
Priority number(s): JP19980375852 19981130

Report a data error here

Abstract of JP2000157285

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new polynucleotide which contains a polynucleotide sequence coding for a polypeptides of LD78 gene group or its complementary polypeptides and is useful in the estimate of the progressive degree of HIV infection or the diagnosis, treatment or the like for AIDS, cancer or the like. **SOLUTION:** This polynucleotide is a purified new polynucleotide containing a polynucleotide sequence coding for the polypeptides of LD78 gene group or its complementary polypeptides and can estimate the disease progressive degree on HIV infectious disease by analyzing the number of chemokine LD78 gene group by means of PCR method and carry out the treatment for HIV infection, e.g. AIDS or the like, and the treatment or the like for cancer by using the polypeptides of this gene group. This purified polynucleotide is obtained by treating the DNA extracted from human peripheral blood lymphocytes with a primer comprising of the partial sequence of LD78 gene by means of PCR method, treating it with a restriction enzyme and separating and purifying the resultant fragments by agarose electrophoresis. When treated with the restriction enzyme, the LD78 B group is cleaved, but the LD78 A group is not cleaved.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-157285

(P2000-157285A)

(43) 公開日 平成12年6月13日 (2000.6.13)

| (51) Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | コード (参考) |
|---------------------------|-------|---------------|-------------------|
| C 1 2 N 15/09 | Z N A | C 1 2 N 15/00 | Z N A A 4 B 0 2 4 |
| A 6 1 P 31/18 | | A 6 1 K 31/00 | 6 3 1 M 4 B 0 6 3 |
| | | | 6 3 5 4 C 0 8 4 |
| A 6 1 K 38/00 | | C 0 7 K 14/52 | 4 H 0 4 5 |
| C 0 7 K 14/52 | | C 1 2 Q 1/68 | A |

審査請求 未請求 請求項の数 4 書面 (全 6 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-375852
 (22) 出願日 平成10年11月30日 (1998. 11. 30)

(71) 出願人 599005435
 小原 健志
 熊本市渡鹿三丁目15-34
 (72) 発明者 小原 健志
 熊本市渡鹿三丁目15-34
 Fターム (参考) 4B024 AA01 BA21 CA04 DA03 EA04
 HA11 HA17 HA20
 4B063 QA01 QA19 QQ10 QQ43 QR32
 QR62 QR79 QS25
 4C084 AA02 BA44 DA01 NA05 NA14
 ZB262 ZB332 ZC552
 4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 DA01
 EA22 EA50 FA74

(54) 【発明の名称】 LD78遺伝子群ケモカインとホモログペプチド

a)

(57) 【要約】
 本発明は、新規のケモカインLD78遺伝子群を同定し、コードするアミノ酸配列及びヌクレオチドを提供する。本発明には、LD78遺伝子群をコードするヌクレオチド配列の検出のためのハイブリダイゼーションプローブまたはオリゴヌクレオチド、LD78遺伝子群をコードする核酸分子に基づく、炎症または疾病の診断テスト方法、AIDS、癌の治療も含まれる。
 【課題】本発明は、HIV感染症における病気進行の度合いを予測する方法である。また、HIV感染症の新規の治療法、癌の治療法に関するものである。
 【解決手段】我々により単離された遺伝子群の数をPCR法により解析することにより病気進行の度合いを予測する。また、この遺伝子群のポリペプチドを用いてHIV感染の治療、癌の治療を行う方法を提示する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】LD78遺伝子群のポリペプチド、またはその相補的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むことを特徴とする精製ポリヌクレオチド。

【請求項2】生物学的試料においてLD78遺伝子群をコードするヌクレオチド配列を検出するための診断テスト方法であって、a)前記生物学的試料と、配列番号：1のヌクレオチド配列を含む第1ヌクレオチド配列、若しくはそのフラグメントとを、核酸ハイブリダイゼーション複合体の形成に適切な条件の下で結合する過程と、
b)前記ハイブリダイゼーション複合体を検出する過程であって、前記複合体の存在が、前記生物学的試料におけるLD78遺伝子群をコードする第2ヌクレオチド配列の存在と相関している、該過程と、
c)前記試料における前記第2ヌクレオチド配列の量と標準値とを比較し、前記第2ヌクレオチド配列の量が前記標準値と異なっているか否かを判定する過程であって、前記第2ヌクレオチド配列の異常レベルの存在が、炎症に関連する状態と正の相関を有する、該過程とを有することを特徴とする診断テスト方法。

【請求項3】HIVに関連する疾病を治療するための薬化学的組成物であって、効果的な量の、請求項1に記載のポリペプチド配列と、薬化学的に適格な担体とを有することを特徴とするHIVに関連する疾病を治療するための薬化学的組成物。

【請求項4】癌に関連する疾病を患う患者を治療する方法であって、前記患者に、請求項1に記載の前記薬化学的組成物を効果的な量投与する過程を含むことを特徴とする癌に関連する疾病を患う患者を治療する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規のケモカインLD78遺伝子群を同定し、コードするアミノ酸配列及びヌクレオチドを提供する。本発明には、LD78遺伝子群をコードするヌクレオチド配列の検出のためのハイブリダイゼーションプローブまたはオリゴヌクレオチド、LD78遺伝子群をコードする核酸分子に基づく、疾病の診断テスト方法、AIDS、癌の治療も含まれる。

【0002】

【従来の技術】HIV感染症における病気進行の度合いを予測する方法についての遺伝子学的方法是確立されていず、病気進行の度合いに応じて治療法を選択することが困難である。HIV感染症の治療においては、薬剤の開発により改善してきているが、まだ、完全にウイルスを消滅させることはできていない。また、薬剤耐性ウイルスが出現するため薬剤が無効になってしまう症例が多い。癌の治療法においては、手術による切除、抗癌剤、放射線治療を用いた方法が開発されているが、まだ十分な物ではなく、死因の第一である事に変わらない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】従って、HIV感染症における病気進行の度合いを遺伝子で予測することが望まれている。HIV感染症の治療においては、薬剤耐性ウイルスが出現するなどの問題があるため、異なった観点からの治療法が開発が望まれている。ケモカインは抗ウイルス活性が報告されているが、有効濃度が高く100から1000ng/mlと高いため、臨床的に実用性が低いと考えられている。そこで、有効濃度が低いケモカインが望まれている。癌の治療法においては、癌の生物学的特徴を分子標的として治療する方法が望まれているが、抗体を用いた方法が開発されているが、まだ十分な物ではない。

【0004】

【課題を解決するための手段】抗ウイルス効果を持つヒトLD78(マウスのMIP-1 α に相当する)遺伝子(Obaru et al. JB 99, 885-94, 1986)に相同性の高い遺伝子群が存在することを最近見出した。この遺伝子群は10個以上の遺伝子からなり、互いに94%から98%の相同性を有する。この遺伝子群の最大の特徴は、この遺伝子群の遺伝子を全て持つヒトから一部分を持つヒトまで種々のパターンが存在することである。このように遺伝子の部分欠損を含む遺伝子のポリモルフィズムはこれ迄報告されていない。塩基配列決定の結果、この遺伝子群には93アミノ酸残基の内5個のアミノ酸残基が種々の組み合わせで異なっている遺伝子が存在した。21、22、25、62、70番目のアミノ酸残基が異なっており、21、22、25アミノ酸残基は第一エクソンに含まれ、62アミノ酸残基は、第二エクソン、70アミノ酸残基は、第三エクソンに含まれていた。21、22アミノ酸残基を基にLD78A群とLD78B群に分類した。制限酵素ScaIまたはAvaIは、LD78B群の21、22アミノ酸残基をコードする領域を切断するが、LD78A群を切断しない。このことを利用したPCR-RFLP法により、LD78A群とLD78B群の遺伝子の相対的量を比較した。HIV感染症の治療において、これらのLD78遺伝子群のポリペプチドを酵母で発現させ、ウイルス増殖抑制活性があるかを評価する。癌の治療法においては、これらのLD78遺伝子群のポリペプチドを酵母で発現させ、癌増殖抑制があるかを観察する。

【0005】

【発明の実施の形態】遺伝子群の単離：LD78-G5' : ACTAAG AATAg CCTTgggTTgAC、LD78-G3' : TTCCTCCATTTCACCTCTTCCのプライマーを用いてPCRを行い、全長のLD78遺伝子を増幅する。このDNAを制限酵素MspIとStuIと切断し、1.2%のアガロースで電気泳動する。エチジウムブロミドで染色すると、個人により持つ遺伝子が異なっているため、検出されるパ

ンドが異なっている。このDNAをTA cloning kit (Invitrogen, USA) によりクローニングし、制限酵素切断地図が異なる遺伝子を単離し塩基配列を決定する(図1)。この方法により10個の異なる制限酵素切断地図をもつ遺伝子が単離された(図2)。塩基配列の結果これらの遺伝子は96-98%の相同性を持つことが明らかになった。アミノ酸配列では、LD78 α (Obaru et al. JB 99, 885-94, 1986)、LD78 β (Nakao et al. Mol. and Cell Biol., 10(7):3646-3658 (1990)) と同一の物の他に、アミノ酸残基が62番と70番が異なる配列が見い出された。このように、LD78 α とLD78 β と異なるアミノ酸配列をもつ、これらの配列はデータベースにおいても検出されず新規と思われる(図3)。

病気進行の予測：これらの遺伝子群を21、22アミノ酸残基をもとに、LD78A群とLD78B群に2群に大別した。ヒトの末梢血リンパ球からDNAを抽出しLD78cop5' : g t c a t g a g t t a g a g c t g a g a g t t a g a g LD78cop3' : t g a t g t g g t c t a a c c a t g g c c a g a g a g t プライマーでPCRし、制限酵素AvaIIで切断すると、LD78B群は、切断されるが、LD78A群は切断されない(図4)。2%のアガロースで電気泳動すると、LD78B群は270bp、LD78A群は340bpのバンドが検出される。これをCCDカメラを用いたデンストグラフで解析し、LD78A群とLD78B群の遺伝子の数を比較することができる。

同様にLD78-628C : a g a c t a g g a g g g c t a a g a c c, LD78-365 : A T G C A G C T C T C C A C T G C T G C C C T T でPCRを行い、制限酵素ScrFIで切断すると、LD78B群は、切断されるが、LD78A群は切断されない(図5)。2%のアガロースで電気泳動すると、LD78B群は206bp、LD78A群は262bpのバンドが検出される。これをCCDカメラを用いたデンストグラフで解析し、LD78A群とLD78B群の遺伝子の数を比較することができる。

抗ウイルス効果：LD78A群とLD78B群の遺伝子を酵母発現ベクター(Pichia Expression Kit Invitrogen, USA)に導入し、培養上清を濃縮し、イオン交換カラム(HiTrap SP)で分画し、逆相カラム(Vydac Prot C4)で分離した。このポリペプチドをヒト子宮頸癌の細胞株(Hela cell)にCD4と β -gal LTRとケモカインレセプターの一つCCR5を発現させた細胞株に2時間培養した後、HIVウイルス液を加え2日間培養する。その後、X-galを加えると感染した細胞では、HIV上の遺伝子tatが発現されLT

Rを活性化しガラクトシダーゼの発現を増加し、X-galを分解し青色に細胞核が染まる。この青染した細胞核を数えることにより感染の阻止効果が評価できる。

抗腫瘍効果：ヒト子宮頸癌の細胞株(Hela cell)にケモカインレセプターの一つCCR5を発現させた細胞株にLD78A群とLD78B群のポリペプチドを加え一晩培養し、観察する。また生細胞数をWST1法を用いて計測する。

【0006】

【発明の効果】病気進行の予測：長期非進行者20例と進行者50例を上記の方法、制限酵素AvaIIを用いた方法で解析したところ、長期非進行者では、LD78A群が優位であり、進行者ではLD78B群が優位であった(図6)。また、同様に、長期非進行者20例と進行者50例を上記の方法、制限酵素ScrFIを用いた方法で解析したところ、長期非進行者では、LD78A群が優位であり、進行者ではLD78B群が優位であった(図7)。このように、制限酵素AvaIIまたは、ScrFIを用いた何れの方法でも長期非進行者では、LD78A群が優位であり、進行者ではLD78B群が優位であり、この方法の有益性がしめされている。抗ウイルス効果：LD78A群とB群の抗ウイルス効果は、LD78Bが、LD78Aより抗ウイルス効果が20倍以上強い事が分かった(図8)。LD78- α では既に、抗ウイルス効果が知られているが、本発明ではそれより強い抗ウイルス活性を有しており、HIVの感染阻止に非常に有益と思われる。

抗腫瘍効果：LD78A群とB群の抗腫瘍効果を上記の方法で観察した。LD78B群のポリペプチドでは、細胞核が濃縮し、細胞質が崩壊しているのが観察される。しかし、LD78A群のポリペプチドでは、何ら変化は、観察されなかった。また、生細胞数をWST1アッセイで調べたところ、LD78B群のポリペプチドでは、濃度依存性に生細胞数が減少したのに対してLD78A群のポリペプチドでは生細胞数の減少は認められなかった(図9)。このことは、LD78B群のポリペプチドにより強い抗腫瘍効果があることを示している。このような活性は、これまでケモカインにおいては、全く報告がなく新規の活性である。また、このような活性の存在は、癌の治療法に新しい戦略を与えようと言う点で極めて有益と思われる。

【0007】

【図面の簡単な説明】

【図1】LD78遺伝子群の単離：ヒト末梢血DNAをPCRし、LD78遺伝子群を増幅し制限酵素で切断し1.3%アガロースゲルで電気泳動すると、個人のもつLD78遺伝子群の組み合わせが異なるため、出現するバンドの組み合わせが異なる。また遺伝子をサブクローニングし遺伝子群のなかの一つ一つの遺伝子を単離し塩基配列を決定する。

b)

10

20

30

40

50

【図2】LD78遺伝子群の制限酵素切断地図：少なくとも10個の遺伝子が単離された。

【図3】LD78遺伝子群のアミノ酸配列の比較：五個のアミノ酸が異なっている。

【図4】LD78A群とLD78B群遺伝子数の比較 (AvalI) :

LD78cop5' : g t c a t g a g t t a g a g c t g a g a g t t a g a g LD78cop3' : t g a t g t g g t c t a a c c a t g g c c a g a g a g t プライマーでPCRし、制限酵素AvalIで切断すると、LD78B群は、切断されるが、LD78A群は切断されない。2%のアガロースで電気泳動すると、LD78B群は270bp、LD78A群は340bpのバンドが検出される。これをCCDカメラで撮影し各バンドの濃さを決めた。

【図5】LD78A群とLD78B群遺伝子数の比較 (ScrFI)

LD78-628C : a g a c t a g g a g g g c t a a g a c c、LD78-365 : A T G C A G G T C T C C A C T G C T G C C C T T でPCRを行い、制限酵素ScrFIで切断すると、LD78B群は、切断されるが、LD78A群は切断されない。2%のアガロース

で電気泳動すると、LD78B群は206bp、LD78A群は262bpのバンドが検出される。これをCCDカメラで撮影し各バンドの濃さを決めた。

【図6】LD78-A群とLD78-B群遺伝子数の比較 (AvalI) : デンシトグラフで解析した結果、LD78B群由来のバンドの濃さをLD78A群由来のバンドの濃さで割った数値をプロットしてある。丸は症例を表している。LTNPは長期非進行者、Pは進行者である。

【図7】LD78-A群とLD78-B群遺伝子数の比較 (ScrFI) デンシトグラフで解析した結果、LD78B群由来のバンドの濃さをLD78A群由来のバンドの濃さで割った数値をプロットしてある。丸は症例を表している。LTNPは長期非進行者、Pは進行者である。

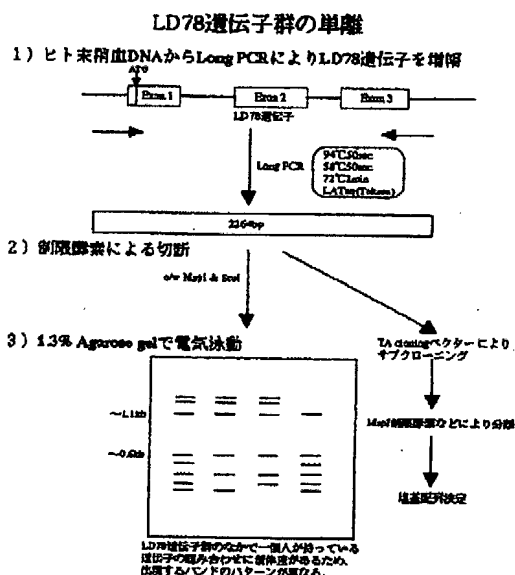
【図8】LD78AとLD78Bの抗ウイルス効果 (MAGI/CCR5)

青染した細胞核の数を計測した。

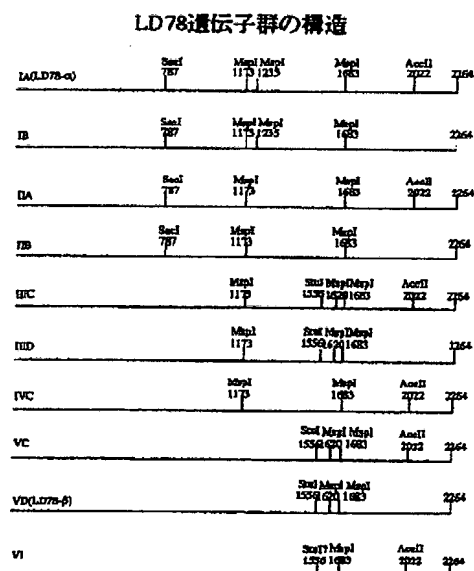
【図9】LD78AとLD78Bの抗腫瘍効果 (WST-1アッセイの原理)

各濃度における450nmの吸光度をプロットしている。

【図1】

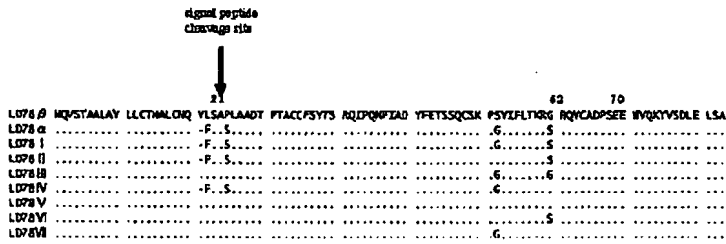


【図2】



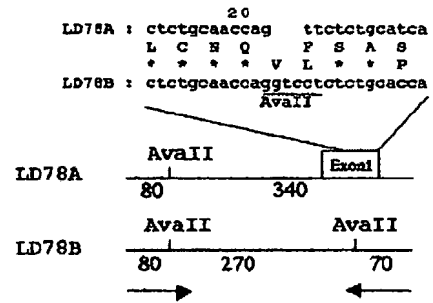
【図3】

LD78遺伝子群のアミノ酸配列の比較



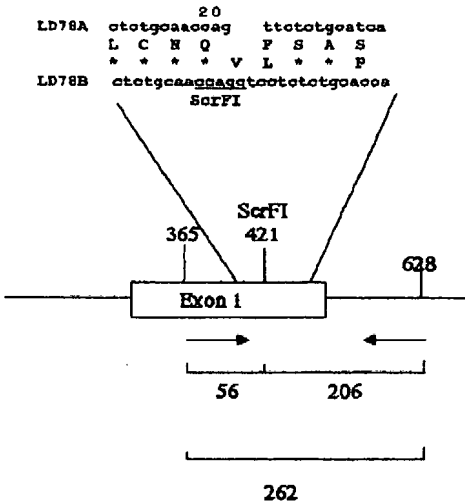
【図4】

LD78A群とLD78B群遺伝子数の比較



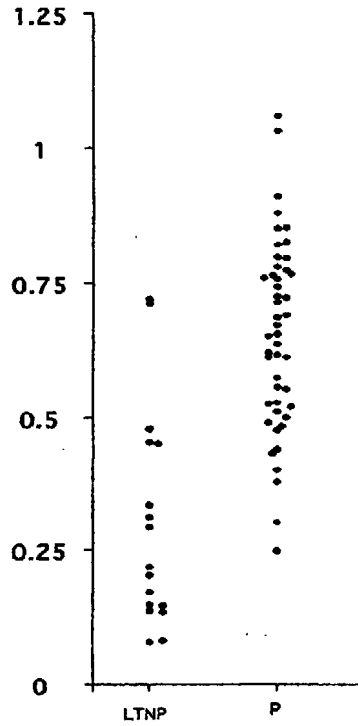
【図5】

LD78-A群とLD78-B群遺伝子数の比較(ScrFI)



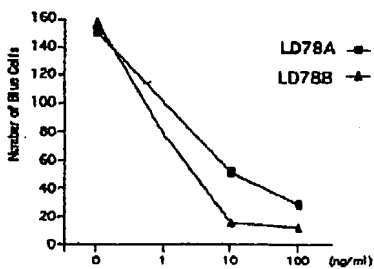
【図6】

LD78-A群とLD78-B群遺伝子数の比較(AvaII)



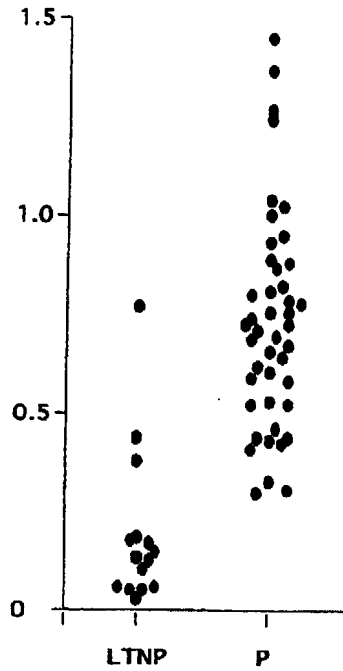
【図8】

LD78AとLD78Bの抗ウイルス効果 (MAGI/CCR5)



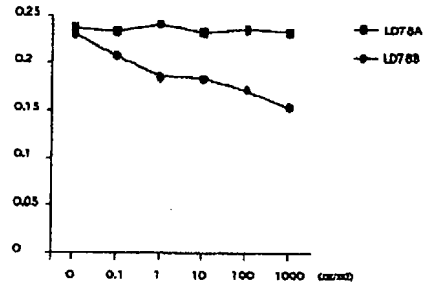
【図7】

LD78-A群とLD78-B群遺伝子数の比較(ScrPI)

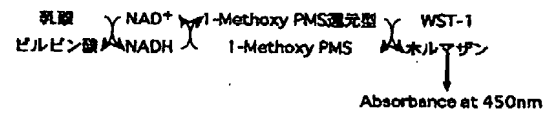


【図9】

LD78AとLD78Bの抗腫瘍効果 (WST-1 assay)



生細胞数の計測 (WST-1 assayの原理)



フロントページの続き

(51)Int. Cl. 7

C 1 2 Q 1/68

G 0 1 N 33/15

識別記号

F I

G 0 1 N 33/15

A 6 1 K 37/02

テームコード (参考)

Z

English Translation
JP2000-157285A
Published on Jun.13, 2000

Part a) :

(57) [ABSTRACT]

The invention provides an amino acid sequence and a nucleotide which identify and encode a novel chemokine LD78 gene group. The invention includes a hybridization probe or oligonucleotide for detecting a nucleotide sequence which encodes LD78 gene group, a diagnostic test method for inflammation or disease based on a nucleic acid molecule encoding LD78 gene group, and therapy of AIDS or cancer.

[PROBLEM] The invention is directed to a method for predicting the degree of advancement of the disease in HIV infections. In addition, the invention also relates to a novel therapeutic method for HIV infections and a therapeutic method for cancer.

[MEANS FOR SOLUTION] The degree of advancement of a disease is predicted by analyzing the number of the gene group isolated by the inventor with the PCR method. In addition, the invention presents a method for carrying out a therapy of HIV infection and a therapy of cancer with the polypeptide in the gene group.

Part b) :

[EFFECT OF INVENTION] Prediction of advancement of disease: With the above method, a method using restriction enzyme Avall, 20 long term non-advanced subjects and 50 advanced subjects

were analyzed. As a result, the LD78A group dominated in the long term non-advanced subjects and the LD78B group dominated in the advanced subjects (FIG. 6). Similarly, with the above method, a method using restriction enzyme ScrFI, 20 long term non-advanced subjects and 50 advanced subjects were analyzed. As a result, the LD78A group dominated in the long term non-advanced subjects and the LD78B group dominated in the advanced subjects (FIG. 7). As seen in the result, either in the method using the restriction enzyme Avall or in the method using the restriction enzyme ScrFI, the LD78A group dominated in the long term non-advanced subjects and the LD78B group dominated in the advanced subjects. This result indicated usefulness of the invented method.

Antiviral effect: Comparison of antiviral effects in the LD78A group and the LD78B group revealed that the LD78B had a 20 times larger antiviral effect than LD78A (FIG. 8). Although an antiviral effect has already been known for LD78- α , more intensive antiviral activity was shown for the invented product and hence it is considered that the product is very useful for inhibition of HIV infection.

Antitumor effect: Antitumor effects in the LD78A group and LD78B group were observed with the above described method. In a polypeptide in the LD78B group, it was observed that cell nuclei

English Translation

JP2000-157285A

Published on Jun.13, 2000

were concentrated and cytoplasms were disintegrated. However, in a polypeptide of the LD78A group, no change was observed. The viable cell number was counted by WST1 assay. In the polypeptide of the LD78B group, the viable cell number decreased the concentration dependent manner. On the other hand, in the polypeptide of the LD78A group, decrease in the viable cell number was not observed (FIG. 9). This indicated that the polypeptide in the LD78B group had a more intensive antitumor effect. These activities have never been reported for chemokines and therefore it is a newly discovered activity. In addition, it is considered that the existence of such an activity is very useful from the viewpoint that a novel strategy is given for the treatment of cancer.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT OR DRAWING
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- GRAY SCALE DOCUMENTS
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.